

課題番号 : F-17-KT-0065
利用形態 : 機器利用
利用課題名(日本語) : 琵琶湖における微生物群集の増殖解析
Program Title(English) : Growth rate of microbial community in Lake Biwa
利用者名(日本語) : 目下部武敏, 山内渚, 沈尚
Username(English) : T. Kusakabe, N. Yamauchi, S. Shen
所属名(日本語) : 京都大学大学院工学研究科
Affiliation(English) : Graduate School of Eng., Kyoto University
キーワード/Keyword : 形状・形態観察、分析、共焦点レーザー走査型顕微鏡、微生物、増殖、琵琶湖

1. 概要(Summary)

本研究では、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)代替法として 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)法の開発を目指した。EdU法では分子サイズの小さい蛍光色素を利用するためDNA変性工程が不要で、BrdU法と比べて効率的に短時間での検出が期待できる。本研究のねらいは、新規EdU法により群集レベルだけでなく、個々の細胞レベルで増殖活性を評価することであり、条件検討の結果から前掲法と細菌の捕集方法を決定した。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000(Olympus)

【実験方法】

採水調査は琵琶湖および瀬田川にて行った。持ち帰った水サンプルは、原生動物を前掲法によってできるだけ速やかに取り除いた後、EdUを添加して取り込ませた。所定時間後に、メンブレンフィルター上に微生物群集を捕集した。捕集した微生物群集は、化学固定および透過処理を行った後、Click-iT® EdU Plus Kit(Thermo)を用いて、新規DNA合成時に取り込まれたEdUの蛍光標識を行った。EdUの蛍光標識色素には、Alexa Flour 488を選定した。DAPI対比染色の後、褪色防止用封入剤を用いてスライドガラスを作成した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000で画像を取得し、解析を行った。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

検討の結果、細菌を捕食する原生動物を取り除くための前掲法にはアイソポア(2.0 μm)を、微生物群集の捕集方法としてアイソポア(0.22 μm)を用いることを決定した。Fig. 1は同一視野における画像であり、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)対比染色では全ての細菌が青色蛍光を、Alexa Flour 488によるEdU染色ではEdU取り込み活性を有した細菌が緑色

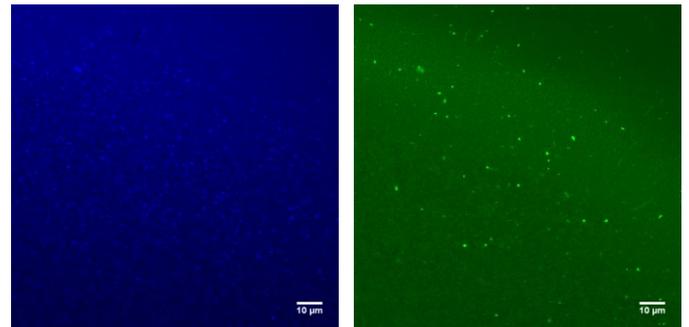


Fig. 1 Photomicrographs of DPAI-(left) and Alexa Flour 488-(right) stained bacteria in Lake Biwa. Scale bar, 10 μm.

蛍光を示し、細胞ごとに増殖活性を評価することが可能であった。

今後は、細菌サイズの画分に存在する微細藻類には光合成色素が含まれており、これらの自家蛍光と考えられる赤色蛍光が確認されたため(Fig. 2)、藻類細胞中の色素を除去する方法の検討を行っていく。

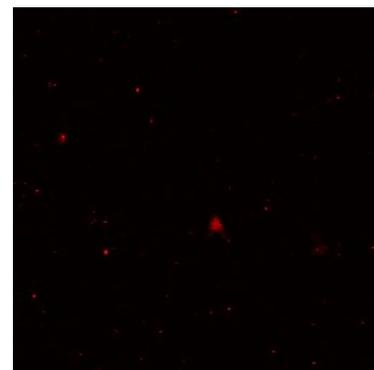


Fig. 2 Photomicrograph of autofluorescence probably originated from algal photosynthetic pigments.

4. その他・特記事項(Others)

特になし。

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

なし。

6. 関連特許(Patent)

なし。